

中国对虾一种杆状病毒的 ELISA 检测方法

涂小林* 钟江** 高双诚* 王颖** 乐云仙** 朱学宝*

(* 上海水产大学, 200090)

(** 复旦大学, 上海 200433)

摘要 从患暴发性传染病的中国对虾组织中分离了一种病毒, 经差速离心、密度梯度离心及 Shepharose 2B 柱层析纯化了一种形状为杆状的病毒。提纯病毒核酸电泳为一条带, 分子量为 20kb。将提纯病毒免疫新西兰兔获得较高效价的抗血清并初步建立了酶联免疫吸附测定 (ELISA) 检测方法。可在六小时内完成对样品的检测, 检测灵敏度达 60 纳克 (ng)。

关键词 中国对虾, 杆状病毒, 酶联免疫吸附测定

近十多年来, 随着对虾养殖业的迅速发展, 集约化程度加强、环境恶化, 对虾病毒病害日趋严重。自 1987 年台湾 [Chen 等, 1989] 池养对虾发生大规模死亡以来, 泰国、马来西亚、菲律宾、新加坡、日本等东南亚养虾地区都不同程度地遭受到病毒病的危害 [Boonyaratpalin 等, 1993; Nash 等, 1988; Turnbull 等, 1994; Yamaguchi 和 Sano, 1988]。此外, 在欧美地区如法国、美国和墨西哥等地, 以及大洋洲的澳大利亚, 对虾病毒时有报导 [Bell 和 Lightner, 1984; Leblanc 和 Overstreet, 1990; Martinez, 1992; Bonami 等, 1990; Vickers 等, 1993]。病毒病害已严重威胁着各国养虾业的发展。

1993 年, 中国沿海养虾地区发生了一场暴发性传染病, 发病对象为 4—7 厘米长的中国对虾 (*Penaeus chinensis*)。该病病程短、死亡快, 在 3 天左右时间造成虾塘绝产, 已进行的研究表明其病原主要为杆状病毒。

国内外对对虾病毒病的研究起步较晚, 目前尚无特效药物治疗该病。主要采取预防措施, 避免病毒病的发生。但病毒的诊断一般采用组织学方法检测病毒包涵体或用组织超薄切片进行病毒的电镜观察来鉴定 [Sinderman 和 Lightner, 1988; Thurman 等, 1990]。这些方法耗时费力, 不宜于大批样品的检测。因此建立快速、敏感和特异的病毒检测方法, 成为当前急待解决的问题之一。本实验旨在制备中国对虾杆状病毒的抗血清, 建立酶联免疫吸附测定 (ELISA) 检测方法, 并进行初步应用。

1 材料与方 法

1.1 病 虾

1993 年上海地区疫区发病的中国对虾。

1.2 病毒的分离与纯化

从病虾中分离出肝胰脏及鳃, 匀浆后冻融, 经差速离心、20—50%蔗糖密度梯度离心,

Sepharose2B 柱层析(2×40cm, 0.01M, pH8.0 硼酸缓冲液洗脱, 流速为 15ml/hr)分离、纯化。在紫外 254nm 处测 O.D. 值, 收集第 1 峰。浓缩后即提纯病毒。

1.3 病毒核酸分析

提纯的病毒经 1%SDS 和 100μg/ml 蛋白酶 K 56℃ 各处理 30 分钟后, 用酚-氯仿法抽提其核酸, 进行琼脂糖凝胶电泳。

1.4 病毒抗血清制备

按常规方法免疫健康新西兰兔两只, 当抗体琼扩效价达到 1:32 时采血, 取血清。用盐析法提纯抗体。

1.5 ELISA 方法的建立和应用

1.5.1 ELISA 检测步骤

被测样品按一定比例用包被液(0.01M, pH9.5 碳酸盐缓冲液)稀释后, 加入到酶标板中, 每孔加 100μl, 于 37℃ 置 2 小时后倾去反应液, 拍干; 加入洗涤液(PBST: 0.01M, pH 7.4 PBS, 含 0.05% Tween80)于 37℃ 下置 3 分钟, 倾去洗涤液, 拍干。如此重复三次; 加入用稀释液(含 0.1% 的牛血清白蛋白的 PBST)按一定比例稀释的纯化病毒抗体, 每孔 100μl, 37℃ 下反应 1 小时; 按前法洗涤三次; 加入用 PBST 按适当比例稀释的酶标羊抗兔 IgG(IgG-HRP, 华美生物工程公司产品), 每孔 100 μl, 于 37℃ 反应 1 小时; 按前法洗涤三次; 加入反应底物液(0.2M 磷酸盐-0.1M 柠檬酸缓冲液 pH5.0, 每 100ml 加 40mg 邻苯二胺和 30% H₂O₂ 150μl, 现配现用), 于 37℃ 反应 30 分钟; 最后加入反应终止液(2M H₂SO₄)每孔 50μl, 用酶标仪(华东电子管厂产品)检测反应的 O.D. 值。

1.5.2 最佳反应条件的选择

采用方阵滴定法, 测病毒抗体和酶标羊抗兔 IgG 的最佳工作浓度。横排作病毒抗体的 1:20, 1:40, 1:80, … 倍比稀释, 纵排作酶标抗抗体(IgG-HRP)的 1:500, 1:1000, 1:2000, 1:4000 稀释, 反应后用酶标仪测 O.D. 值, 选择一抗和酶标抗抗体的最佳工作浓度。

1.5.3 病毒抗原检测

提纯病毒用包被液作倍比稀释后包被酶标板, 按 ELISA 检测步骤进行 O.D. 值检测。

1.5.4 对虾不同组织样品的检测

取出对虾的肌肉、肠道、鳃和肝胰脏, 分别匀浆。离心(10000rpm)10 分钟后取上清为检测样品, 包被酶标板, 进行 ELISA 反应。所取对虾包括: 1993 年发病对虾、未发病虾塘中的对虾、疫区紧急抢捕虾、人工感染发病虾、越冬亲虾、及 1994 年发病虾塘中的对虾。

1.5.5 1994 年发病虾塘与未发病虾塘对虾的检测

六月初, 从上海和苏北地区养殖虾塘采样, 其中有发病虾塘和未发病虾塘。发病塘虾有明显症状, 肝胰脏肿大, 体表色深, 肠道中食物少; 未发病塘虾外观健壮。虾体长为三至六厘米不等。

1.5.6 1993 年疫区紧急抢捕虾的检测

1993 年对虾疾病暴发时, 某养殖场发病严重, 最后一塘采取紧急措施抢捕。收捕后, 取样保存在 -70℃ 冰箱中。取这批虾肝胰脏, 按前法制样, 进行 ELISA 反应。

2 结果

2.1 病毒提纯

病虾肝胰脏经差速离心、密度梯度离心、及 Sepharose2B 柱层析,提纯出一种杆状病毒,大小为 288nm×62.5nm (见图 1)。提纯病毒具有典型病毒粒子紫外(λ230-300nm)吸收特征,如图 2 所示。

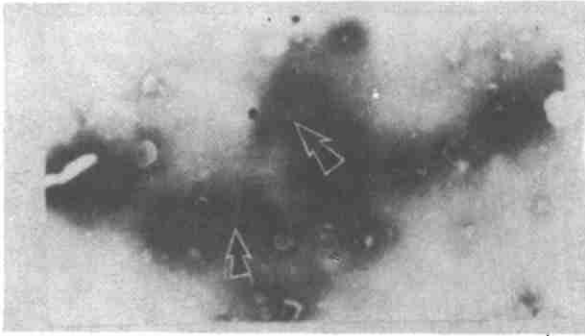


图 1 对虾杆状病毒粒子负染电镜观察(×2000)

Fig. 1 Electron micrographs of purified penaeid virus

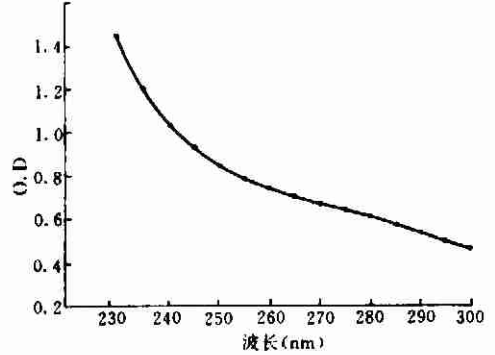


图 2 对虾杆状病毒紫外吸收曲线

Fig. 2 Absorption of purified penaeid virus to ultraviolet(λ230-300nm)

2.2 病毒核酸初步分析

抽提出的病毒核酸电泳结果如图 3 所示,为一条 20kb 左右的核酸条带,由于抽提过程中使用了 RNA 酶,所以该病毒核酸为 DNA。

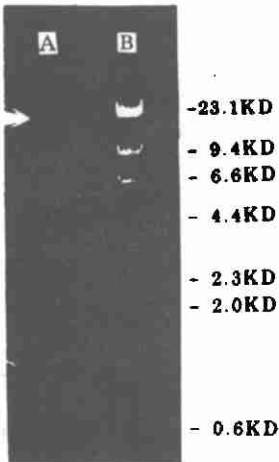


图 3 对虾杆状病毒核酸电泳

Fig. 3 Agarose gel electrophoresis of the viral nucleic acid
A 对虾杆状病毒 DNA
B 标准分子量 DNA

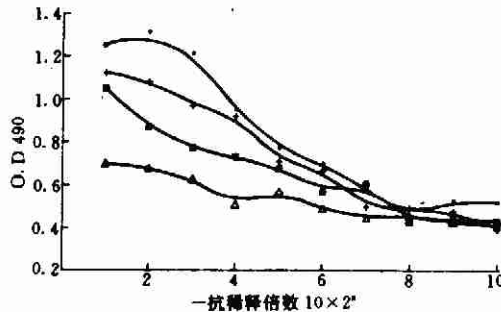


图 4 不同浓度的一抗和酶标抗体的 ELISA 反应
Fig. 4 Optimum concentrations of antibody and conjugated anti-rabbit IgG in ELISA

--- IgG-HRP 1:500 - * - IgG-HRP 1:2000
- + - IgG-HRP 1:1000 - Δ - IgG-HRP 1:4000

2.3 ELISA 最佳反应条件的选择

采用方阵滴定法作病毒抗体和酶标抗抗体的倍比稀释,ELISA 反应结果见图 4。当酶标抗抗体为 1:4000 稀释时,其 O.D. 值均较低;当 1:500 稀释时,其值较高;当为 1:1000 或 1:2000 稀释时能较好地反应 O.D. 值的变化。故酶标抗抗体选用 1:2000 稀释度为其工作浓度。对应一抗的工作浓度选用 1:100。经过对虾组织大量阴性标本的检测,O.D. 值初步定在 0.8 以上为阳性反应。

2.4 病毒抗原检测

提纯病毒从 1:10 开始倍比稀释,包被酶标板,作 ELISA 检测,结果见表 1。呈现阳性反应的最大稀释度为 1:2560(病毒浓度为 1.50mg/ml),可检测出的病毒量约为 60ng。

表 1 病毒抗原的 ELISA 检测
Table 1 Detection of viral antigen by ELISA

稀释度	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:2560	1:5120
O.D 值	2.24	2.21	2.00	1.76	1.56	1.50	1.32	1.16	0.86	0.60
+/-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

2.5 对虾不同组织样品的检测

取对虾的不同组织:肌肉、肠、鳃和肝胰脏等制样检测,结果见表 2。1993 年发病虾、疫区抢捕虾、人工感染发病对虾、越冬亲虾的鳃和肝胰脏及 1994 年发病虾的肝胰脏检测的 O.D. 值较高,为阳性反应;肌肉组织均为阴性反应。1993 年未发病虾组织除鳃组织外均为阴性反应。

表 2 对虾不同组织的 ELISA 检测结果
Table 2 Detection of shrimp tissues by ELISA

虾 样	ELISA 检测结果 +/- (O.D.)			
	肌 肉	肠 道	鳃	肝胰脏
1993 年发病虾	- (0.60)	+ (0.89)	+ (0.90)	+ (1.05)
疫区抢捕虾	- (0.56)	+ (0.84)	+ (0.94)	+ (1.15)
未发病虾	- (0.56)	- (0.71)	+ (0.83)	- (0.71)
人工感染病虾	- (0.43)	- (0.73)	+ (0.86)	+ (1.14)
越冬亲虾	- (0.67)	- (0.75)	+ (1.02)	+ (1.06)
1994 年发病虾	- (0.70)	+ (0.84)		+ (0.86)

2.6 1994 年发病虾塘和未发病虾塘的检测

取 1994 年六月初发病塘虾与未发病塘虾制样检测,结果见表 3。上海和江苏地区发病虾塘的对虾检测结果均呈阳性反应;未发病虾塘的对虾 83.3% 为阴性反应。

2.7 1993 年疫区紧急抢捕虾的检测

1993 年疫区抢捕虾检测结果见表 4。这批虾的阳性率高达 70%。

表 3 发病虾塘与未发病虾塘对虾的 ELISA 检测结果

Table 3 Detection of infected and uninfected penaeid shrimp by ELISA

地 区		发病虾塘				未发病虾塘					
		1	2	3	4	1	2	3	4	5	6
上海地区	O. D.	1.05	1.20	1.25	1.03	0.73	0.41	0.76	0.70	0.87	0.68
	+/-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-
苏北地区	O. D.	0.88	0.85	0.95	1.06	0.32	0.78	0.81	0.56	0.73	0.56
	+/-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-

表 4 疫区收捕虾 ELISA 检测结果

Table 4 Detection of penaeid shrimp captured in pond by ELISA

虾 样	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
O. D.	0.52	1.15	1.01	0.60	1.01	0.98	1.04	1.05	0.90	0.46	0.30
+/-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-

注: * 为空白对照

3 讨论

自 Couch[1974]报道桃红对虾(*Penaeus duorarum*)肝胰脏中的杆状病毒以来,对虾病毒因给养虾业造成重大损失而一直引起人们的密切关注。1987年,台湾池养斑节对虾(*Penaeus monodon*)发生大规模病毒病以来,对虾的病毒病害一直危害着东南亚一带养虾地区,时有大规模流行的报导。由于尚无有效药物来治疗,各养虾国家均从预防入手,采取措施,改善环境,避免苗种,亲虾携带病毒。因此建立病毒的快速检测方法显得较有意义。

目前,对于对虾病毒检测报导较多的工作主要限于病理学,采用肉眼病理、组织病理学方法,即根据临床症状、死亡情况及组织切片、组织超薄切片技术来进行分析、观察。这些方法耗时费力,极易漏检,不宜于大批样品的检测,而且不能作早期感染的检测。本实验从病虾中分离并纯化了一种杆状病毒,该病毒免疫动物获得了病毒的高免血清,利用酶标抗体初步建立了病毒的间接 ELISA 检测技术,可在六小时内完成对病毒的检测,并且易于检测大批样品,可检测到 60ng 水平。

ELISA 方法是继免疫荧光技术和放射免疫技术之后发展起来的一种免疫标记技术,因其对病原的检测具有快速、灵敏和特异的优点而广泛用于生物和医学领域[杜念兴,1985]。本实验建立的 ELISA 检测技术的分辨率为 60ng(10^{-5} mg),大大高于一般免疫学技术的敏感性。可以测出一条病虾少量组织内的抗原,因而该技术为走出实验室、走向生产迈出了一步。

当然,这仅仅是初步的工作,其分辨率还可继续提高,可达 10ng 以下,与 RIA(放射免疫测定)的灵敏度相当[Tijssen 等,1982]。不过,关键还在于获得较大量的纯制杆状病毒制剂作为免疫原。但是,1993年池养中国对虾暴发的这场病毒性疾病,发展非常迅速,2-3天时间就可使全塘对虾死亡,病原野外材料不易获得。另外,由于目前尚未建立室内感染系统,无法藉此得到大量病原材料。因此,当前的迫切任务之一仍是进一步改进病毒提纯技术,以提高 ELISA 反应的实用性。

应用该法检测对虾不同组织,发现1993及1994年天然发病虾及1993年虾病流行时疫区紧急抢捕虾肠道的ELISA检测结果均呈阳性;1993年疫区未发病虾塘的对虾、人工感染发病对虾及越冬棚内亲虾的肠道均呈阴性反应。这一结果预示着在虾病发生时,因对虾的自相残食,特别是对体弱、不食、运动减退的发病虾更易遭受这种攻击,故很可能因此而加速病毒病原的传播。

此外,发现病虾的鳃及肝胰脏中病毒含量较高,肌肉则均呈阴性反应。肝胰脏为中国对虾这场暴发性病毒病的主要病变组织,在其上皮细胞内可见到病毒粒子[蔡完其等,1994],因而ELISA反应呈阳性;鳃一方面直接与外界相联系,另一方面也可能是病毒的靶器官。这个问题尚需作专门的深入研究。但是,这个结果值得考虑,即本实验发现病虾鳃始终呈ELISA阳性反应,而且在1993年虾病暴发流行时,疫区未发病虾塘中对虾的鳃检测结果也为阳性,肝胰脏反而为阴性。这一现象或许可以从检测技术本身加以改进。

在生产上,对上海和苏北地区的养虾场进行采样,取虾肝胰脏制样进行检测反应,结果发病虾塘中对虾均呈ELISA阳性反应,未发病虾塘的对虾83.3%为阴性反应。考虑到采样时正为上海及苏北地区虾病发生时期,未发病塘并不意味着没有病毒存在。况且这两个地区1994年虾病发生情况与1993年相比有所不同:1993年虾病为暴发性发生,造成一个养殖场甚至整个地区的虾塘在很短的时间内,几乎全部绝产;而1994年虾病发生早,持续时间长。早至四月底的3厘米左右的对虾,晚至八月份的8厘米长的对虾都有发病的情况。所以,对上海和苏北地区对虾的检测基本上能反应生产情况。在1993年虾病暴发流行时,某生产单位采取紧急措施抢捕对虾,这些抢捕虾经过抽样检查,发现70%的虾带有病毒,而抢捕虾塘周围的绝大多数塘中对虾都已发病死光,这个塘若不及时抢收,很可能也会造成绝产。这说明及时预报对虾发病情况,生产单位可以及时抢收,减少经济损失。

本文为上海市农委科技兴农重点攻关项目部分内容之一。复旦大学苏德明教授给予了具体指导和帮助,并审阅全文;实验过程中得到上海水产大学原校长乐美龙教授、顾景镠副校长和上海市水产办公室顾惠庭高级工程师的关怀、帮助,以及本校鱼病与微生物学教研室蔡完其副教授等老师的帮助和支持。在此表示衷心的感谢。

参 考 文 献

- [1] 杜念兴, 1985. 兽医免疫学, 211-225. 上海科学技术出版社.
- [2] 蔡完其等, 1994. 患暴发性病毒病的中国对虾肝胰脏病理变化. 上海水产大学学报, 3(1-2): 27-33.
- [3] Bell, T. A. and D. V. Lightner, 1984. IHNV Virus, infectivity and pathogenicity studies in *Penaeus stylirostris* and *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 38(3): 185-194.
- [4] Bonami, J. R. et al., 1990. Purification and characterization of the infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus of penaeid shrimps. *J. Gen. Virol.*, 71(11): 2657-2664.
- [5] Boonyaratpalin, S. et al., 1993. Non-occluded baculo-like virus, the causative agent of yellow head disease in the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*), *Fish Pathology*, 28(3): 103-109.
- [6] Chen, S. N. et al., 1989. Observation on pathogenicity and epizootiology of *Penaeus monodon* baculovirus (MBN) in cultured shrimp in Taiwan. *Fish pathology*, 24(4): 198-195.
- [7] Couch, T. A., 1974. Free and occluded virus, similar to baculovirus, in hepatopancreas of pink shrimp. *Nature*, 247(5438): 229-231.
- [8] Leblanc, B. and R. M. Overstreet, 1990. Prevalance of baculovirus penaei in experimentally infected white shrimp

- (*Penaeus vannamei*) relative to age. *Aquaculture*, **87**(3-4) : 237-242.
- [9] Martinez, C. L. R., 1992. Cultured blue shrimp (*Penaeus stylirostris*) infected with infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus in northwestern Mexico. *Prog. Fish Cult.*, **54**(4) : 265-266.
- [10] Nash, M. *et al.*, 1988. A reo-like virus observed in the tiger prawn, *Penaeus monodon* Fabricius, from Malaysia. *J. Fish Dis.*, **11**(6) : 531-535.
- [11] Sinderman, L. J. and D. V. Lightner, 1988. *Disease diagnosis and control in North American marine aquaculture*. Elsevier science publishing Co., pp11-37.
- [12] Thurman, R. B. *et al.*, 1990. Unique physicochemical properties of the occluded penaeid shrimp baculovirus and their use as diagnosis of infection. *J. Aquat. Anim. Health*, **2**(2) : 128-131.
- [13] Tijssen, P. *et al.*, 1982. Rapid and sensitive heterologous enzyme immunoassays for denonucleosides virus (*Parvoviridae*). *Archives of Virology*, **74** : 277-291.
- [14] Turnbull, J. F. *et al.*, 1994. A histopathological disease survey of cultured shrimp in North East Sumatera, Indonesia. *J. Fish Dis.*, **17**(1) : 57-65.
- [15] Vickers, J. E. *et al.*, 1993. An impression smear method for rapid detection of *Penaeus monodon*-type baculovirus (MBV) in Australian prawns. *J. Fish dis.*, **16**(5) : 507-511.
- [16] Yamaguchi, K. M. and T. Sano, 1988. A method of experimental infection of kurama shrimp larvae, *Penaeus japonicus* bate, with baculovirus mid-gut gland necrosis (BMN) virus. *J. Fish Dis.*, **11**(2) : 105-111.

ELISA FOR THE DETECTION OF A BACULOVIRUS IN *PENAEUS CHINENSIS*

Tu Xiaolin* , Zhong Jiang** , Gao Shuangcheng*

Wang Ying** , Le Yunxian** and Zhu Xuebao*

(* Shanghai Fisheries University, 200090)

(** Fudan University, Shanghai 200433)

ABSTRACT A baculovirus (288×62.5nm) was isolated from hepatopancreas of infected *Penaeus chinensis* during an epizootic in Shanghai suburbs. The virus was purified by gradient centrifugation and Sepharose 2B chromatography. The viral nucleic acid is DNA of m. w. ca. 20kb by agarose gel electrophoresis. An antiserum was prepared and indirect ELISA developed for the virus detection in the penaeid shrimp with gratifying results.

KEYWORDS *Penaeus chinensis*, baculovirus, ELISA